

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl⁷

C12Q 1/00
G01N 33/53

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 98122060.6

[43]公开日 2000年6月7日

[11]公开号 CN 1255552A

[22]申请日 1998.12.1 [21]申请号 98122060.6

[71]申请人 宋克

地址 201800 上海市中科院上海原子核辐射化学室

[72]发明人 宋克

权利要求书2页 说明书20页 附图页数3页

[54]发明名称 通用微方阵

选,各种材料的合成和优化,免疫检测,蛋白组学研究,细菌和病毒的研究和诊断等。

[57]摘要

本发明提供了一种通过在二维空间按既定的地址将具有不同负载特性的光纤或毛细管为基元拼装起来制成的微方阵的技术。该技术的优势一是在于它可以提供高达100万~400万/cm²的微方阵密度潜力,二是在于光纤或毛细管可负载物性质的广泛性。本发明还提供了这些微方阵的各种具体形式如基因芯片,免疫(蛋白)芯片,细胞(受体)芯片,化学(材料)芯片等的制作,信号标记和检测等方面较具体的技术,属于生物,医学,材料科学等的研究和应用技术领域。该法首先是将目标物固定在光纤的一个端面上形成载体式光纤。由大量品种的目标分子的载体光纤构成以光纤为载体的目标分子文库。从这种文库中按顺序取出光纤并依次排列成目标分子载体光纤方阵,经加工形成芯片。用与芯片的微方阵和CCD的像素点方阵对准并连接的光纤束形成信号检测的传导系统。本发明还介绍了一种高度灵敏,快速高效,无毒害的生物发光标记及光学磁珠信号放大技术。本发明可用于高效基因测序,基因表达谱研究,医学基因诊断,基因法学身份鉴定,药物先导化合物的筛

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

- 1、一种将大量不同生物或化学目标分子以方阵形式固定在石英，玻璃或其它惰性基质表面上用于生物学，医学，材料科学的研究和应用的微方阵，其特征是，这种微方阵是以大量独立作为特定目标分子载体的纤维或毛细管状物体以给定顺序组装成的具有特定二维空间地址的拼装式微方阵，根据不同负载特性，可以作成基因芯片，免疫芯片，蛋白芯片，细胞芯片，受体芯片，化学芯片和材料芯片。
- 2、一种可以将大量具有独立负载特征的纤维或毛细管状物体以给定的序列地址组装成微方阵的拼装器，其特征是，这种拼装器由一系列排列器以活字排版形式安插在方阵式支架上构成，用来将光纤或毛细管按一定的序列进行二维平行排列的装置，该装置是由在基片上加工的一系列平行排列的按给定序列装载特定生物分子的小室组成的列室，在列室的对面安装一个磁芯，在上方或下方安装一个可控谐振器，小室是为载有特定同种目标分子的光纤或毛细管提供的地址性可存取库室，每一个小室都有一个宽度略大于所存储的光纤直径或毛细管的外径，长度略大于光纤或毛细管长度的从内及外逐渐变窄的楔形狭缝作为所存储的光纤或毛细管的取出通道，小室垂直于狭缝的尺度须小于毛细管长度，为了确保每次有光纤或毛细管可被取出，狭缝须垂直于，而列室所在的平面须平行于重力线方向，狭缝的出口方向正对着与之间距仅略大于所存储光纤或毛细管的直径或外径且与列室平行安装的磁芯，当磁芯处于开的状态时将有一个光纤或毛细管被取出并被磁力吸附在磁芯表面，由于狭缝宽度和狭缝与磁芯间距的限制，被吸引的后随光纤或毛细管将被卡在小室内，为了理顺光纤或毛细管在小室尤其是在锥形狭缝附近的取向性确保每次有且仅有单根光纤或毛细管被取出，在正对着列室的平行于重力线方向安装一个可控谐振器以施加一个与磁场协同作用的可控谐振机械波，可控谐振器与磁芯的协同作用，是将开关磁场及可控谐振机械波同时瞬间处于工作状态从而仅将单个光纤或毛细管吸附到狭缝外的磁芯上，当二者同时处于停止状态时由于重力的作用吸附着的光纤或毛细管将垂直下落，而小室内的光纤或毛细管也会沿着楔形狭缝的斜面滑向小室的深处等待下一个周期可控谐

权 利 要 求 书

振器与磁芯的协同作用，列室中有一个供光纤或毛细管下落的密闭轨道，其上部有一个进气孔，下部有一个出气孔，当磁芯和可控谐振器停止工作时，气流开始工作由上而下将光纤或毛细管依次推下至方阵式支架形成列片，当磁芯和可控谐振器开始工作时气流关闭，方阵式支架用以将列片叠放为方阵形式，首先将排列好的光纤或毛细管用胶固化，再将固化的光纤或毛细管列按给定的次序进行曲叠放形成方阵，固化，将未固定有目标分子的端面裁剪，研磨，抛光形成芯片，活字排版式拼装器是指制作芯片时其所包含信息内容的确定可以自由地筛选，拼装器的方阵式支架的每个单元内都有具有用于为磁芯提供 的电流的电极，用于将列片胶固化的涂胶及固化部件和用于将这些列片传送到可以以给定顺序叠放的部分。

- 3、一种借助于制冷数码相机（CCD）可以同时全范围高灵敏检测微方阵的通过各种方式产生的光信号的检测仪器，其特征是，将方阵与制冷数码相机的像素点方阵和待分析微方阵相匹配的光纤束与前二者的方阵对准连接，并将该光纤束从制冷腔里引出从而使得对微方阵的检测在极大提高信噪比的前提下可以在常温下操作。
- 4、一种微方阵检测中的信号标记放大技术，其特征是，将探针分子用报告分子进行初步标记，然后用与报告分子有高特异性和高亲和能力的报告分子配体与固定了大量信号分子的微小颗粒连接，检测时，通过形成固相载体-目标分子-探针分子-报告分子-报告分子配体-微小颗粒-信号分子的方式进行，可以将信号放大几个数量级。
- 5、根据权利要求 1 所述的在石英或玻璃表面上固定目标分子的表面预处理方法可以在下列方法 中择一：(1) 气相，液相硅烷化， (2) 硅基化， (3) 非共价表面(亲和) 吸咐，以及 (4) 由上述这些方法结合产生的方法中的任何一种。

2011.10.17

说 明 书

通 用 微 方 阵

本发明属于生物，医学，材料科学等技术领域。

微方阵的另一个通用术语就是芯片，微方阵在这里是指非计算机领域里的广义芯片。为区别起见，我们在广义场合下使用微方阵，而就其中某一具体形式则称之为芯片。现在主要是指基因芯片和材料芯片。高密度基因芯片主要通过微电子光刻技术原位合成生产寡聚核苷酸芯片，最高可达 40 万个寡聚核苷酸/平方厘米，代表 6000~8000 个基因。其缺点是重复性极差，目前仅用于科研领域；还有 cDNA 膜芯片，密度高达 2000 个基因/平方厘米。由于它是以尼龙膜或硝酸纤维素膜为基质进行点膜，随着密度增大，样品之间的相互污染难以避免，从而限制了其密度。

本发明采用玻璃或石英材质的光纤或毛细管为生物或化学目标分子的载体，并以大量不同的载体为基元根据给定的二维空间地址将它们一一排列起来并进一步拼装成芯片。这类芯片的密度直接取决于光纤或毛细管的外径。目前光纤的最小外径系列为 5~10 微米，其所能提供的最大芯片密度潜力为 100 万~400 万/平方厘米。毛细管主要用于制作细胞芯片，其外径目前所知道的在 140 微米，可以用以制作密度高达 3000~5000/平方厘米的细胞芯片。由于毛细管基芯片的巨大的内表面积，也可以将之发展成为较低密度的用于定量检测的生物大分子芯片。本技术的优势不仅在于它能提供芯片的超高密度，还在于适用范围的广谱性和可再生性。

本发明的目的在于从技术上找到进一步大幅度提高这种通用的芯片密度的基础性方法。这里将要提供的技术内容包括涉及高密度芯片的制造技术，自动化设备的原理设计及其制造工艺，在各领域里的用途及其相应的使用方法。在各个领域里高密度芯片都可以找到相当有潜力的应用前景。比如在核酸领域里，高密度基因芯片可以极大地提高基因测序和基因表达谱研究。目前人类基因组的测序工作已工厂化，旨在加速测序进程。现在基因研究中大量的人力和经费都是投入到单调的测序中。高密度基因芯片，尤其是密度高达几十万甚至上百万的高密度基因芯片将从根本上使基因测序工作变得简易和快速；用于分析人类等位基因多态性的基因芯片可以为人们提供了一个强有力的，万无一失的基因身份鉴定系统；在蛋白质领域里，高密度免疫芯片可以大幅度提高免疫诊断的效率并扩大其诊断谱。高密度蛋白和化学芯片将为刚刚兴起的蛋白组学研究提供一个极其有力的武器。高密度细胞（受体）芯片在新药先导化合物筛选和建立化合物结构及其生物活性的关系等领域的研究中有着现实的应用价值。在材料科学的研究中，材料芯片将可以使材料的合成和优化效率提高几个甚至几十个数量级。

说 明 书

本发明从总体上可以分为：

- 1.芯片制作技术，包括信号标记，目标物固定，芯片拼装等方面；
- 2.芯片生产线中各设备的原理设计及制造工艺；
- 3.信号检测和数据处理技术及设备；
- 4.全自动杂交及系统整合；
- 5.芯片在各个领域里的应用及使用方法。

一、芯片制作原理

本发明制作芯片的基本原理是以光纤或毛细管等形式的载体为基元，将要固定的目标物(即，将要被固定在光纤端面上的生物或化学分子以及将要被固定在毛细管内壁上的细胞或目标分子等)直接或间接地固定在光纤端面或毛细管内壁上，然后将固定有各种不同目标物的光纤或毛细管分类，排序，按址存放并构建成载体形式的文库。制作芯片时，首先将载体从文库中取出按顺序批量装入光纤或毛细管拼装器的各个单元内，经光纤或毛细管拼装器的三维排列形成光纤或毛细管方阵。最后将光纤方阵未固定有目标物的端面进行一些加工后形成约3~5厘米厚的芯片。

信号标记是指在分析物分子上通过共价合成或生物亲和的方式连接一个或多个信号标记分子。在本发明中主要采用了生物发光，酶联免疫化学发光和荧光的标记方法。

目标物固定是指将要检测的目标分子或细胞以共价键或非共价键形式连接到光纤端面或毛细管内壁上。

二、芯片生产线的设计及其制造工艺

由于我们的芯片未采用常规的“点膜式”或原位合成制作技术，而是一种“拼装式”的芯片，而且所选用的光纤通常极细，因此操作它们的机械零件必须具有足够高的精密度并微型化。借助微电子技术中已发展很成熟对硅材料的微细加工技术，可以制作出高度精密，高度集成的芯片生产线。芯片生产线的工作原理是：首先将若干种目标分子载体如光纤或毛细管根据各自所固定的分子种类逐个存放在刻蚀在硅衬底上独立的一字二维排列的不同的小室(Closet)列内，建立目标分子与小室地址(Closet No.)的一一对应关系。将一列这样按即定顺序排列并存放不同目标分子载体的小室定义为列室(train)，并将若干个这样的列室按已知的地址特征存放在一个目标分子载体的文库(library)里。

光纤或毛细管拼装器(简称拼装器(assembler))的基础是光纤或毛细管排列器(简称排列器(displacer))。所谓拼装器就是用一系列支架(cartridge)按确定的地址将排列器定位起来并为每一个排列器的正常工作供气，电，谐振机械能和胶粘剂等的全自动装置。排列器由列室，拾取器(fetcher)构成，目的是为了将储存在列室中每个小室的光纤或毛细管每次分别只取一个然后遵照列室中地址相应紧密的平行排列，并最终形成一个胶合起来的光纤列片或毛细管列片(简称列片，sheet)。若干个这些列片经自动叠放装置最终叠放并胶合成光纤或毛细管方阵(array)。再经过一些后续加工过程，最后形成芯片。下面具体介绍这种拼装器的特征，

说 明 书

其结构及工作原理见图 8。

图 1-1 是拼装器的基本单位—小室的工作原理图。小室的设计目的是为了确保在施加一个一定强度的电磁脉冲的情况下仅有一根光纤或毛细管从小室中被取出。其基本原理是通过化学刻蚀的方法形成的锥型槽的底部有一个被刻蚀透的小缝。这个小缝的宽度只比所要储存的光纤直径略大一点(比如光纤直径为 10 微米时缝的宽度可以是 12~15 微米左右)，其目的是仅让一根光纤顺利地通过，而不允许两根以上的光纤同时通过。这种小室的密封端是不透气的。工作时，在小室的前方放置一个磁场及其强度可以瞬时在 1 或 0 之间变换的开关磁场发生器，如软磁铁铝合金磁芯。由于光纤是预先经过磁性材料镀过的，所以一旦磁场开关处于开的状态将会有一个个光纤被吸引出来。为了确保仅有一个光纤被取出，必须将铁铝合金磁芯和小室的小缝靠得足够近(最佳距离应是略大于一个但小于两个光纤的直径尺度)以确保第二根光纤无法被吸引出来。由于光纤的纵向尺度远大于小室的深度，所以光纤在小室中颠倒过来的情况是可以排除的。但是这仍然存在着光纤在其中堆放不整齐的情况，而且这种杂乱会使得纵使磁场很强时小缝近处的光纤被干扰而无法被正常吸引出去。这种情况是绝对不允许的。因为在一列室中每次哪怕仅有一个光纤未能取出都会造成“移位突变”使整个光纤的二维排列次序出现错误。为了确保光纤在小缝端口的排列或取向与小缝一致从而有利于顺利取出，在小室或列室的上方或下方垂直向上或向下施加一个强度微弱但足以使光纤发生上下谐振的脉冲式可控声波谐振器。声波谐振器与开关磁场协同作用。即它们同时处于开的或关的状态，这样的电子开关可以设计一个简单的电子线路板使其统一接受电脑的时钟控制来做成。声波谐振器使光纤在缝口附近的取向与小缝一致，因为在一致时，光纤被磁场吸引又被越来越窄的缝口钳制，这种形式十分利于被取出。光纤被取出后还不能在重力作用下下降，因为磁场足够强以致于光纤被随即“粘”在磁芯上。由于磁芯与小室壁间距及缝口宽度的限制，被取出光纤的后随者只能被堵在缝口内侧而不能出来。然后去除声波谐振和磁场作用，此时被粘在磁芯上的光纤能否掉下来取决于剩磁的存在特性。一般来说，软磁铁铝合金磁芯的剩磁很小，在间隔短时间之后已不足以将后随者吸引出来。为尽量减少剩磁问题，要使得产生开关磁场的电流强度尽量小，只要能够将小室中的光纤都吸引起来即可。由于光纤本身分量很轻而且空间尺度很小，距磁芯很近，所以所需要的开关磁场强度必将很小。那么由此所产生剩磁将微乎其微。这种度量要从实验中去摸索最佳参数。在几秒钟(在剩磁可以忽略不计的情况下不必有时间间隔)之后，使一小股气流如氮气自上而下流经小室的缝口将光纤推下(光纤在自身重力的作用下可以自行下落，但为确保迅速下落特地加上一股气流去强制)。

小室是由在硅衬底上经过微加工(化学蚀刻)形成的一个 V 型槽(见图 1-2)经一面密封构成。小室及列室的制作工艺可以简述为：

硅片(厚 1~2mm)→磨平抛光→切割成矩形(如 500×5×2mm)硅片→二次抛光→保偏膜制作→CAD 化学蚀刻保偏膜设计→化学蚀刻→成型→装载目标物载体，如光纤等→封闭 V 型

槽的喇叭型开口(图 1-1 所示)→封盖小缝→装入支架(形成 Fig.1-3 所示的列室)或存入文库。

每一个小室实际上是一个装载数以万计的光纤或毛细管的微型仓库。由于光纤的尺寸一般为 3~5 毫米长, 5~20 微米或更粗, 所以一个高 1 毫米, 底 0.775mm 的锥型槽即可容纳 10000 根直径 20 微米的光纤。为了组装芯片的方便, 可以将几百个甚至上千个这些微型仓库精密地集成在 500×5×2mm 的硅片上。上述刻蚀用的是可以从硅材料厂购得并进行了研磨和抛光等工艺处理的(100)各向异性单晶硅, 保偏膜可以使用氮化硅沉积或二氧化硅氧化法等, 借助于 CAD(计算机辅助设计)可以设计出满足要求的保偏膜来。对施加了保偏膜的硅衬底进行化学蚀刻时可以使用如下腐蚀液配方: KOH 23.4%(wt), 丙醇 13.3wt%, H₂O 63.3wt%。温度为 80 度时各晶面的刻蚀速度分别如下: (100)面, 0.6 微米/min; (110)面, 0.1 微米/min; (111)面, 0.006 微米/min。在<100>面的腐蚀角为 54.74°。在 85 度用 KOH 作腐蚀剂时两种保偏膜的腐蚀速率为: 二氧化硅, 14Å/min; Si₃N₄, ~0Å/min. 可以根据这些参数, 小缝的宽度, 硅衬底的厚度等确定出通过 CAD 设计保偏膜的参数。

对每一列室装载目标物载体小缝加盖和喇叭口密封后可以首先存入目标分子文库里, 如急需可以直接插入拼装器内。

图 1-3 为列室与起密封和减震作用的橡皮封条(rubber buffer), 起保护作用的刚性护套(holder)的装配示意图。

图 1-4 为装配起来的列室与 E 型软磁铁铝合金磁芯的装配图(主视图)。它是作为图 1-5 的 A-A 方向的横截面主视图(附加了用以表示装配后相互位置关系的列室的结构)。图 1-5 中氮气从上方进气口进入, 经下方的出气口导出, 同时将吸引出来的光纤或毛细管垂直推下并紧密地二维平行排列起来。随即被下部的涂胶孔涂胶, 固化后形成光纤列片或毛细管列片(sheet)。

图 1-6 是列片的叠放装置—芯片拼装器原理示意图。它是由若干个以支架(cartridge)形式表现的支架阵。其中的每一个支架都有一套可以转换电流方向和强度(用于消除剩磁的)电极, 一套通气孔和一个涂胶孔。这些“电气水”的供给途径都是接触式的或一插即通, 一拔即断的。这种设计宗旨是为了使得芯片拼装器在选录具体的列室—“选字”及安排其地址—“排版”时可以受到活字排版思想的启发并能根据具体的实际需要灵活地加以运用。借助于现在的自动化控制技术要做到通过仅仅操作计算机键盘即可实现具体生产中对拼装器的排版工作完全是可能的。

信号检测及数据处理系统

信号检测方式取决于信号本身的特征。对于上述可见光信号的特点, 可以采用光学显微技术。这是一种十分成熟的光学透镜系统, 显然, 对于高密度芯片也可以使用它。但是, 采用这种体系有它不便的一面, 即它必须将芯片要么进行分区检测将信号传递到小巧的感光部位上, 要么一次成像到庞大的信号接受系统上去。二者对于上述高密度芯片的可见光信号的检测都是不现实的。这里采用一种新型的适合于高密度芯片需要的检测系统。其特

征是，结构紧凑，小巧，一次性信号载荷大，最大可满足一次传递和检测每平方厘米 2,160,900 个超弱光点信号的要求(由于目前国际国内所能提供的光纤的直径尺寸在 5~10 微米，所以这个信号传输量尚未突破我们所能制作的芯片密度极限)。

信号检测由检测系统和与之相适应的芯片结构两个方面组成。检测系统的原理如图 2 所示，它由科学制冷电荷转移器件(Scientific Cooled CCD Camera)和信号导引光纤束组成。

电荷转移器件(Charge Coupled Device,简称 CCD)是一种可以同时做到在二维空间的视野内对每一点光信号的位置和强度进行同时积分式记录并转换成数字形式的检测仪器。原理上，由于半导体硅的能隙较窄(1.12eV)，受波长范围在 400~1100 纳米的光激发后可以产生电子-空穴对，从而实现光电转换。借助微电子学中对硅片的微细加工技术目前可以做到将这些单元硅片做的很小(当前 CCD 中使用的最高密度的像素点(pixel)尺寸为 6.8 微米)。将这些分立的单元硅片产生的电荷通过时钟电压，移位寄存器进行分列转移并通过模拟-数字转化器(ADC)进一步转化为数字信号，最后在计算机中储存和在荧屏上显示出来。适合于高密度芯片检测要求的科学 CCD 有如下几个方面的特殊要求：

- 1.采用背面光照。采用这种方式是为了获得最大限度的光量子效率，因为 CCD 采用背面光照式硅芯片时具有最大的填充系数，现在有的 CCD 硅芯片的填充系数可以高达 100%(fill factor=100%)，即在相邻像素点(pixel)之间没有死空间(dead space)。
- 2.致冷 CCD(Cooled CCD)。制冷温度要达到 $-40\sim-60^\circ\text{C}$ ，最好达到 -60°C 。目前有商品出售的科研用制冷 CCD 可以达到这个温度要求的一般采用乙二醇或空气制冷。制冷温度在这个温度下，由热振动产生的电子-空穴对造成的热噪音--暗电流(Dark Current)降低到 ~ 0 。制冷温度在 4°C 以下时需要对 CCD 感光硅芯片预先进行并维持真空操作以防止水蒸气凝结。否则，其周围的水蒸气会给低温检测带来不少麻烦。
- 3.光纤束信号导引式检测，无网格像素点方阵(CCD Chip)。像素点方阵(CCD Chip)直接和信号导引光纤束对准并紧密连接。这种光纤束信号导引方式的采用十分有利于将 CCD 感光硅芯片与待检测的样品作为两个密闭的系统隔离开来，为单独针对 CCD 感光硅芯片进行高真空和深制冷操作提供了技术支持，同时也为待检测的生物或化学芯片在检测过程中有特殊要求的温度，气压和湿度等条件提供了必要的技术支持。因为一般的生物或化学反应都要求足够的温度和溶液条件，真空和低温对于一般的化学和生物反应来说是一个不可逾越的障碍。在这里光纤束的信号导引引起了关键的桥梁作用。当然，对于待测生物或化学芯片如果具有很高的信息储存密度，即每根光纤或毛细管的直径都很小的情况下，信号导引光纤束不仅要和 CCD 感光硅芯片精确地对准，而且要和待测生物或化学芯片上的每一个将要发出的点信号精确的对准。也就是说，最好是 CCD 感光硅芯片-信号导引光纤束-待测生物或化学芯片三位一体精密配套。这种精密对准的连接可以得到现有技术条件的支持。利用工业上成熟的精确连接技术将光纤方阵束以内嵌的方式作为数码相机的一部分。

说 明 书

4.多位 ADC(一般应达到 12 位以上)。这种要求是针对为了降低 ADC 的量化噪音(Quantization Noise,QN)而设置的。因为在 ADC 转换过程中存在一个舍入误差,这是量化噪音的来源,在量化噪音存在的前提下信号检测的信噪比(Signal-to-Noise Ratio,SNR)与 ADC 的位数有如下关系:

$$SNR_{QN} = (6b+11)\text{dB}$$

其中 b 为 ADC 的位数。所以一个高质量的科研用 CCD 需要高的 ADC 位数,现已商品化的科研用 CCD 一般具有 8~16 位,我们采用的 CCD 应尽量具有较多的 ADC 位数。这种要求同时也考虑到最大程度地增大 CCD 可以检测的动态范围(Dynamic Range)和提高检测相对灵敏度,从而有效防止检测中的信号泻溢(Blooming)现象。

由于我们的芯片也是以光纤或毛细管方阵的形式存在,而且它本身也可以起到导光的作用。所以我们需要的只是将这些配套的方阵(同样的排列方式,点间距和密度。这里的点是指芯片上的每个与目标物固定端面相对应的另一端抛光端面和数码相机的每个像素点(pixel))精确地对准和紧密地连接起来。光纤基芯片的目标物固定端面或毛细管基芯片的目标物固定面—毛细管内壁用来与触发剂接触。对于光纤基芯片而言,可以用后向散射的方式将光反射进去,而且为了增大光纤的导光效率,采用多模(multimode)大数值孔径(NA)光纤。为了防止信号的随即散射引起的邻近光纤之间的信号干扰,本发明特意将目标物固定端面在固定目标物之前通过化学刻蚀技术刻蚀出一个浅的凹面(凹面的深度略微超过目标物杂交后的颗粒总尺寸但又不至于影响到杂交和与触发剂接触的流体力学和试剂扩散所必要的目标物及其杂交后与触发剂的足够的接触程度)并将目标物固定在这个凹面上。为此要求在光纤上镀上一层化学惰性金属镀层,如镍,银等。考虑到光纤内信号传导中的倏逝场(Evanescent Wave)与光纤的强度和韧性等问题,这种金属镀层的厚度至少应有 1 微米。它的形成工艺一般是通过蒸镀或化学镀的方法将镍沉积在裸光纤上,通过这种方法可以在光纤表面形成一层厚度均一的约 0.6~2 微米厚的镀层。镍等磁性金属镀层的形成将为以后光纤的磁性操作提供方便。另外,在化学蚀刻过程中,采用氟氢酸系列蚀刻剂对银等金属呈惰性而可以有效地对石英或玻璃质的光纤纤芯进行蚀刻,从而利于形成我们所需要凹面。比较蒸镀和化学镀,化学镀法相比而言具有所需要的设备简单,成本底,镀层均匀致密等优点,所以我们倾向于采用化学镀。在光纤上镀金属镀列室大体可以分以下几个步骤:

1. 化学预镀银: 化学预镀银的目的是为了在玻璃或石英光纤的表面形成一层很薄的银镀层,这层银表面可以作为化学镀镍的表面催化剂,从而有利于化学镀镍。化学预镀银过程中所使用的硝酸银溶液较稀,配方如下:

AgNO₃ 8g/l; NH₃•H₂O(25%) 适量;

酒石酸钾钠 KNaC₄H₄C₆•4H₂O 10g/l;

温度 10~20°C, 时间 10 分钟

配置时,先将硝酸银溶解于水,不断搅拌并加入氨水,生成沉淀后再不断加入

说 明 书

氨水直到沉淀完全溶解，然后在加入已溶于水的还原剂。

2. 化学镀镍：碱性化学镀镍的组成和工艺条件如下：

NiSO₄•7H₂O 25(g/l); Na₂HPO₄•H₂O 25(g/l);

Na₄P₂O₇•10H₂O 50(g/l); pH 10~11;

温度 65~75°C; 沉积速度 15 微米/小时;

镀列室中含磷量: ~5% (镀层略具磁性)

3. 化学镀银：化学镀银的主要目的是为了在化学镀镍的表面上再覆盖一层化学惰性保护列室，已经受得住以后的酸碱高温等处理过程。化学镀银的基本步骤和上述过程相同，只是硝酸银和酒石酸钠的浓度增大：

AgNO₃ 20g/l; NH₃•H₂O(25%) 适量;

酒石酸钾钠 KNaC₄H₄C₆•4H₂O 100g/l;

温度 10~20°C, 时间 10 分钟

注：光纤或毛细管上也可以镀上铁铝合金（含铝 9%）以形成剩磁极小的软磁镀层从而利于光纤或毛细管的拾取器的操作。

为了进一步减少邻近光信号的干扰，在信号触发剂的配方中加入反向散射显著的 Mie 散射粒子(Mie scattering particles)。效果显著的这一类粒子较好来源有聚丙烯酰胺胶体和聚苯乙烯乳胶等，粒子的尺寸一般等于光谱仪可见光波长的大小。

二、对于固定细胞的毛细管基芯片，由于细胞的尺寸本身要比生物大分子大得多，在几十个微米左右，所以细胞芯片的密度只能做到 5000/平方厘米。各种细胞被固定在玻璃毛细管内表面并制作成芯片以后，其在检测方面与光纤基芯片的检测原理相似，区别在于与 CCD 感光硅芯片精确对准的信号导引光纤束不再需要与毛细管基芯片进行精确对准。因为前二者的单元尺寸与后者的相比要小的多。另一个区别就是在检测中毛细管基芯片与触发剂的接触方式不是使触发剂流经芯片表面，而是使触发剂穿透它。

数据处理系统：适应科研用制冷 CCD 量化的二维定位检测的数据处理软件目前已可以从因特网上得到，但是这些软件一般都是用于图象处理。我们具体需要的是开发出高密度芯片检测需要的系统软件。这些软件应能够建立起 CCD 检测得到的图象上的每一个点与其所代表的有关生物或化学的具体的信息内容。显然建立这样的一一对应关系（基因文库或蛋白质文库—随着蛋白组研究的不断深入将要建立的话—中每一个基因或蛋白质的具体特性内容与 CCD 检测到的每个点的亮度和位置对应起来）的软件在理论上并没有大的技术性难关，需要的只是工作量。

注：由于光纤或毛细管的导光性质，由这种材质制成的芯片同样适用于对于其上以其它方式发生的可见光或荧光等的检测。比如通过在芯片一侧用激光等方式激发，而产生的荧光可以从另一侧用 CCD 进行检测。这在技术上是十分容易做到的。

为了实现芯片应用的快速高效，重复性好和精确性高，并使用户使用简便易学，将芯片检测和杂交等的主要操作实现自动化完全是必要的。一个适合于上述 FB-cDNA 芯片的全自动杂交系统如图 5 所示包括以下几个系统：

1. 空载芯片和杂交芯片的循环传输系统，包括芯片盒(chip cartridges)，运送轨道(tracks or belts)及相关的精确定位和传动系统；
2. 自动温度调制系统包括检测后芯片的变性温度控制，杂交温育系统温度控制；
3. 流体给排系统包括检测时触发剂原位注射，变性液清洗，空载芯片杂交液给排。

系统整合是将自动化杂交系统和信号检测及数据处理系统整合成一个完整的体系，实现由一个终端控制。

实施例一 cDNA 芯片的制作及应用

目前已经知道人类基因组共有十万个表达基因，这些可以表达的结构性功能基因决定着人类的生老病死等诸多有关每个人生理特征的方方面面。

- (1) 从生物学上讲，这些基因的活动直接决定着涉及到生物学研究的诸多方面，考察基因的调控成为研究工作的极其重要的手段。
- (2) 在医学上，现代研究结果表明，不仅仅是遗传病，癌症，爱滋病，人类的绝大多数疾病都直接或间接地与基因有关。而且许多疑难病症如糖尿病，红斑狼疮，牛皮癣等都往往涉及到诸多基因，称多基因病。高密度基因芯片将为分子医学研究从总体上综合分析和考察这些大病和疑难病提供大量准确和全面的基因根据。另外了解与基因相关的遗传病对于优生优育提高全民族人口素质有着迫切的需要。而高密度基因芯片就可以提供一个简便而全面的遗传病学上的婚前检查根据。
- (3) 在法学上，目前已经知道人类的个体特异性是由大约 500 种等位基因的多态性决定。也就是说，根据一个人的这些基因就可以推测出该人的长相及体格特征。这无疑为人们提供了一条更具直观性和全面的法学身份鉴定的新途径。而 cDNA 芯片正可以作为一种方便的分析系统。
- (4) 在制药领域及药理学研究方面，为了了解一种药物化合物结构的具体作用特征，研究工作者不得不对表达基因进行大规模测序，以了解具体的基因表达谱特征。国外很多大型制药厂每天都将巨额的资金和人力投入到简单而枯燥的基因测序。这种测序方法不仅投资巨大而且还很慢。最急需高密度基因芯片的，同时高密度基因芯片能够带来最大效益的莫过于这个领域。

如果能够将所有这些基因信息都存储在一个平方厘米见方的基因芯片上必将为相关的各个领域提供极大的方便。事实上，光纤基芯片不仅能将人类十万个基因信息全息地存储在 1 平方厘米见方的芯片上，还能够对它们进行定量检测。这将为生物学，医学和制药领域研究人类基因表达谱提供一个全息，高效，量化，廉价的策略性人类基因检测工具。

I-cDNA 芯片的制作

90·12·17

首先将一束石英或玻璃光纤（在纤芯上具有一层金属或其它顺磁性反光镀层，如镍等镀层）裁剪成等长光纤束，然后将两端抛光。所有用来制作芯片的光纤经裁剪，抛光后都必须具有均一的长度，端面光洁度和垂直于纤芯的端面（所依赖的光纤处理技术在涉及到光纤生产的各个领域里业已发展成熟，这里不再述及）。这些光洁的端面将用来直接或间接地固定 cDNA 分子。下面将着三种方法分别予以阐述：

一、硅基化法固定 cDNA 分子：

通过将玻璃表面硅烷化或其它表面处理的直接固定长链核苷酸的方法已在玻璃基因芯片技术中得以采用，这种技术显然也适用于制作以石英或玻璃为材质的光纤或毛细管芯片。迄今为止，已发展出根据不同需要将有机分子共价连接到玻璃表面的烷基化方法，大致可以分为气相和液相两类。下面将液相法的主要过程阐述如下：

- (1)预处理：首先将光纤束（具有镀银惰性保护层）裁剪整齐，两端研磨，抛光，浸入氟氢酸和盐酸腐蚀液中刻蚀，掌握时间和温度条件，可以在光纤的两端腐蚀出两个凹面(也可以仅在一个端面上形成凹面)。凹面的深度依目标分子的大小来确定。
- (2)将光纤放入铬酸中浸泡一小时，再用 6M 盐酸清洗 24 小时。最后再用大量的水进行冲洗。
- (3)用 100 毫升 10% 的己用磷酸调至 pH3.5 的 GOPS((3-甘油醇丙氧基)-三甲基氨基-硅烷,96%)处理上述光纤，将混合物加热到 90 度 2 小时.然后,光纤再分别用 100 毫升的水,无水丙酮和无水乙醚依次冲洗一次,过夜凉干.
- (4)然后用可溶性碳二亚胺(carbodiimide, CDI)缩水法将链亲和素(SA)直接将链亲和素连接到玻璃或石英光纤的凹面上.
- (5)也可以活化连接到石英或玻璃表面的 GOPS.即,将光纤用 50 毫升的无水丙酮冲洗三次,将光纤转移到干净, 干燥的容器内.再向容器内加入毫升无水丙酮和 0.70 毫升的无水吡啶.轻轻搅拌溶液同时缓慢加入 200 微升的 tresyl chloride.然后将反应混合物温度控制在零度 25 分钟,再将光纤依次用 100 毫升体积配比为 30/70,50/50,70/30(丙酮-5mM HCl)的溶液和 100 毫升的 1mM HCl 冲洗一次.
- (6)将 0.1 毫升的 SA 溶液(~1 毫克/毫升)放入一个小的玻璃试管中,再在其中加 9.90 毫升 0.10M pH6.0 的碱金素磷酸盐缓冲液 (PBS),25 毫升 EDTA,6mM DDT(dithiothreitol).接着冲氮气 2 小时。此后 SA 被固定到玻璃或石英表面上。用 0.1M pH7.4 的 PBS 和 0.1M 磷酸反复清洗光纤表面。这样可以清除未牢固连接的蛋白质。再用 1mM TRIS 缓冲液(pH8.2)清洗一边。

二、气相硅烷化法固定 cDNA 分子：

气相硅烷化法在石英或玻璃表面固定生物大分子化合物速度相对较慢，但是蛋白在基质表面分布均匀而且稠密，因此是比较好的一种方法。程序如下：

- (1)将预处理的光纤用 NH₄OH-H₂O₂-H₂O(1:1:5)的溶液在 80 度温度下洗涤 5 分钟，再用

说 明 书

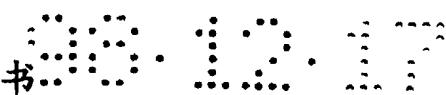
配比为 HC1-H₂O₂-H₂O(1:1:5)的溶液在 80 度温度下洗涤 5 分钟，最后再在双蒸水中彻底清洗一次。这种处理方法使得玻璃表面更加亲水性。

- (2)用氮气流将上述光纤吹干，并立即转入一圆底烧瓶。硅烷被放入一个放有冰水混合物摄氏零度的杜瓦瓶里。缓慢升高该瓶的温度使其中的 3-((2-胺基乙基)胺基-)丙基)三甲氧硅烷 (Union Carbide, USA) 蒸出。此时将系统抽真空使硅烷缓慢地从杜瓦瓶中进入圆底烧瓶再引出，过程持续 24 小时。当硅烷的真空蒸馏温度达到 160 度时，再蒸馏 12 小时。之后可以将系统冷却到室温，硅烷化的光纤放入乙醇中待用。
- (3)上述硅烷化引入的胺基可以通过碳二亚胺为耦联剂用以共价连接一些生物大分子。这种合成方法是首先在表面上引入一个保护巯基，然后通过巯基-二硫键置换反应将蛋白质连接到表面上去。交换反应用双功能试剂 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯 (SPDP) (Pharmacia, Uppsala, Sweden)。这种固定法消除了分子交联和共聚问题从而产生一致密单分子层。
- (4)通过上述各种方法获得的固定在光纤端面的 SA 单分子层膜与过量的末端生物素化的 cDNA 分子-B-cDNA 溶液进行亲和反应生成耦联到光纤端面上的 cDNA 分子。cDNA 末端生物素化的方法见方法四—核酸的末端生物素化法。

- (3)'上述第(2)步由硅烷化法引入的胺基也可以通过戊二醛法将 3' 端或 5' 端具有引入胺基的 cDNA 片段直接连接到石英或玻璃表面。例如在 3' 端引入胺基的方法如下：
- ①在 30ml 吡啶的 15mmol 1, 3-丙二醇中在 15 分钟内逐滴加入 4, 4'-氯化二甲氧基三苯甲基溶液 13mmol，搅拌 3 小时；②之后加 5% 的 NaHCO₃ 水溶液 60 毫升；用二氯甲烷(50ml×2)，分别用水及无水硫酸钠洗涤有机相；③用旋转蒸发器蒸发溶剂，获取油状残余，并将之过硅胶柱，之后用二氯甲烷洗脱，得黄色油状终产物 1-O-二甲氧基三苯甲基-1,3-丙二醇, HO-(CH₂)₂-O-DMT；④将 10 克烷胺基控制多孔玻璃珠(LCAA-CPG)放入装有 50 毫升吡啶的容量瓶中，在其中加入 2mmol 琥珀酸, 4-二甲基胺基吡啶(3.3mol)，加盖，摇晃 16~20 小时；⑤用漏斗过滤 CPG，再分别用吡啶，二氯甲烷和乙醚清洗；⑥在真空中干燥长链烷胺基-丙酮酸-CPG(LCAAP-CPG)，并将干燥物放入 15 毫升的吡啶再加入 HO-(CH₂)₂-O-DMT 0.5mmol, 0.1mmol 4-二甲基胺基吡啶，80 微升三乙胺，和二乙基碳二亚胺 2mmol。摇晃 24 小时，加入 0.5mmol 五氯苯酚，振荡过夜；⑦过滤 CPG，分别用吡啶，二氯甲烷和乙醚清洗之，并放入容量瓶中；⑧在容量瓶中 10 毫升哌啶，摇晃 6 小时，再用二氯甲烷洗涤，再经真空中干燥得 3' 端胺基化的 cDNA 片段；⑨加入适量浓度的戊二醛反应；⑩将端面引入胺基的光纤或毛细管浸入反应混合液，振荡 24 小时取出。最后脱去 CPG，再用二次蒸馏水清洗多次。

三、光纤-磁珠耦联法固定 cDNA 分子：

为了进一步增大芯片的有效表面积，这里重点介绍一种间接固定 cDNA 分子的方法，



即光纤-磁珠耦联法。这种方法首先是在纤芯端面上形成一 SA 涂层，然后用以直链烷烃连接起来的双生物素与固定在纤芯端面上的 SA 进行亲和反应形成双生物素-亲和素-光纤复合体。使用双生物素的目的是为了将光纤和磁珠耦联起来。为此，用来与 SA 亲和的双生物素必须满足一定的条件，如起连接作用的直链烷烃的亚甲基数目最好为 9 或 10 个，因为过长或过短都会影响连接效率。这种双生物素-亲和素-光纤复合体与过量的 SA 包被的光学磁珠进行亲和反应，生成光纤-磁珠复合体。对未结合的磁珠经简单的冲洗分离后，纯化的光纤-磁珠复合体与生物素化的 cDNA 分子进行亲和反应形成光纤-磁珠-cDNA 复合体。这种光纤-磁珠-cDNA 复合体就是构成 cDNA 芯片的基本要素。它们以光纤的形式存在。用上述方法以各种不同的 cDNA 目标分子可以制作不同的光纤-磁珠-cDNA 复合体，把它们分类集中存放从而可以构建光纤-磁珠-cDNA 文库。制作 cDNA 芯片时，先将光纤-磁珠-cDNA 装入光纤排列器中，由光纤排列器按既定的顺序将光纤-磁珠-cDNA 平行排列，排列好的光纤-磁珠-cDNA 再经光纤拼装器排列成 FB-cDNA 方阵(FB-cDNA array)。

这些 FB-cDNA 方阵经过裁剪形成 3~5 厘米厚，1 平方厘米见方的薄片，再将裁剪形成的薄片新端面抛光，这样就形成了 FB-cDNA 芯片(FB-cDNA chips)。

四、核酸的末端生物素化或地高辛化法：

后合成衍生法(postsynthetic derivatization)是对从天然生物或酶法合成得到的核酸进行修饰的唯一方法。通常情况下 3'-和 5'-末端衍生修饰基团在与互补序列杂交中相当有利，而链内衍生修饰基团却往往干扰杂交。这种末端衍生法可以分为以下几步反应：

- (1) 核酸 3'-或 5'-伯氨基的合成：10 微升(0.005~5A₂₆₀U)长链核酸在室温下与 5 微升 1.5M CDI(水溶性碳二亚胺，如 1-乙基-3,3-二甲基-胺基丙基碳二亚胺)和 10 微升 0.5M 1-甲基咪唑,pH7.2 的溶液反应 1 小时后尽快通过凝胶过滤的方法从反应体系中除去，生成化合物 IIIA，该化合物进一步在 50 摄氏度的 0.2~0.4M 的胺 NH₂(CH₂)_nNH₂ 中反应 2~4 小时即生成末端带有自由伯胺基的核酸。
- (2) 生成 5'-或 3'-生物素化的核酸：上述(0.01~10A₂₆₀U)氨基末端核酸与过量(1mg)的 NHS-生物素(N-羟基-琥珀酰胺基生物素)在 0.2ml 的 0.2M HEPES 缓冲溶液(pH8.0)中(振荡)反应 1 小时生成 5'-或 3'-生物素化的核酸。过量未反应的生物素用离心法除去，而 5'-或 3'-生物素化核酸用 HPLC 或凝胶电泳方法分离纯化。
- (3) 生成 5'-或 3'-地高辛化的核酸：反应(1)的产物直接用于地高辛化的反应。在反应体系 0.2ml 0.2M HEPES 缓冲液(pH8.0)中，(0.01~10A₂₆₀U)氨基末端核酸与过量(~1.2mg)地高辛琥珀酸酯室温反应 1 小时，用 HPLC 进行产物分离，纯化。

五、直接共价固定法：

由第四(1)步生成的末端带有自由伯胺基的核酸可以用戊二醛法直接结合到表面具有游离胺基的经硅烷化的石英或玻璃表面上，具体步骤参见 I: 二: (3)。

六、酶法加尾标记程序：

加尾反应在 20 微升装有 0.2M potassium cacodylate, 25mM Tris-HCl(pH6.6), 0.25g/l 牛血清白蛋白, 5mM CoCl₂, 0.5mM dATP, 50μM Dig-dUTP, 25U 末端转移酶和 100pmol 的探针分子 mRNA。在 1 小时 37 度的温浴后, 加尾探针用分子大小色谱的 Nap-5(Sephadex G-25 柱, Pharmacia, Montreal, PQ, Canada) 柱纯化两次, 探针分子的最终浓度为 60nM。这种方法同样可以合成地高辛加尾的 DNA 探针。

目前加尾探针标记法已经商业化对于大多数对有机合成不很熟悉的生物工作者可以直接购买相关的试剂盒, 只要精确地按照商家的指示去做一般都可以很好地标记。

II--信号标记

用于与芯片上的目标分子结合并显示与之结合的标记方法因情况而异, 种类繁多, 各有千秋, 而且都已十分成熟, 这里不在赘述。可以说, 像荧光标记, 酶联放大标记法, 如碱性磷酸酶放大系统, 和化学发光标记等, 这些方法都已达到了非常灵敏的程度, 基本上可以满足高密度芯片的检测的要求。这里仅介绍一种生物标记法。有别于同位素标记等上述方法, 这里选择的生物发光体系兼具上述体系的许多优点, 如高灵敏度, 高效率(快速)的发光特性(该特性决定了它具有比同位素标记和酶联放大法更低的检测极限和更高的检测效率), 可以长期常温储存, 安全无毒害(无放射性污染, 无毒, 无致癌性, 为生产, 储运和使用带来方便)。而且这里还引用了一种特殊的放大方法, 使这种方法可望检测到单个分子。这种生物发光体系就是水母发光蛋白(aequorin)体系。在发光蛋白中, 具有类似发光效率的还有水蛭发光蛋白(obellin)等。水母发光蛋白的发光反应如图 3 所示。

发光蛋白的发光反应都是以钙离子为触发剂, 如图 3 所示, 水母发光蛋白从脱辅基水母发光蛋白(apo-aequorin, 简写为 Apo-aeq)开始。先后分别与虫荧光素(luciferin)和分子氧结合形成水母发光蛋白, 之后与钙离子逐步结合形成生物发光分子。现在已经通过基因工程技术产生出可以在大肠杆菌或真核细菌中大量表达的量子效率更高的 Apo-aeq cDNA 载体。无论是野生的还是重组的脱辅基水母发光蛋白都有很高的热稳定性, 可以长期储存, 因此为生产和储运带来方便。

脱辅基水母发光蛋白的标记采用地高辛-抗地高辛抗体的亲和反应。地高辛是一种心血管药物, 标记用量的地高辛是无毒的。使用地高辛的好处是人体和其它动植物组织不存在这种相关抗原, 所以, 抗地高辛抗体抗体检测时不会发生非特异性结合问题, 当然也不会发生与生物素-亲和素的交叉反应。这样也就可以大幅度提高信噪比。用于与高密度 FB-cDNA 芯片杂交的 mRNA 分子不采用 PCR 标记法, 因为它远远不能满足待测样品中分子种类庞大的分析要求, 纵使采用最近发展起来的多重 PCR(multi-PCR)技术。这里采用加尾式标记方法, 即, 将从组织中提纯的 mRNA, 甚至是总量 RNA 末端通过直接的方式统统加上生物发光分子构成分子探针。

关于构筑分子探针, 我们遵循在不影响杂交特异性的前提下尽量提高杂交效率。根据对非同位素标记的膜杂交和检测研究报告, 仅含有 20~30 个单体的寡聚核苷酸探针杂交的

特异性与有几千个碱基的长链核酸的杂交特异性实际上是一样的，而杂交的效率却高得多，一般可以在即分钟内完成。而几千个碱基的核酸的杂交却需要几个小时。因此我们倾向于构筑由内切酶酶切的短寡聚核苷酸为探针去与长链 cDNA 目标分子杂交。即将总 RNA 或 mRNA 用 RNA 内切酶酶切，再将酶切产物用过量的活化地高辛以末端标记法(见上述方法 I-四-(3))全部标记。反应产物直接用以杂交。

不具有信号放大作用的标记方法常规是直接将信号分子连接到分子探针上，如将荧光分子，化学发光分子，酶分子等直接于核酸连接。这里不作为介绍重点。

具有信号放大作用的生成分子探针的方法可分为如下几个步骤：

一、光学磁珠的信号放大作用：

将抗地高辛抗体和脱辅基水母发光蛋白按一定比例共价地连接到光学磁珠上去。使用光学磁珠是为了大幅度地进行信号放大，因为现在已经可以找到方法在一个直径仅 1 微米的光学磁珠上固定大约 1000~10000 个蛋白质分子，通过这一步，我们就可以将信号放大 3~4 个数量级。下面介绍往羧基化的磁珠(carboxylated superparamagnetic microspheres,CSM)上结合抗地高辛抗体和脱辅基水母发光蛋白的方法和操作过程。所使用的羧基化磁珠已有商品出售(0.8 微米，10%w/w 悬浮液，Bangs laboratories,Carmel,IN,USA)。共价结合的原理是通过可溶性碳二亚胺反应。由于脱辅基水母发光蛋白极易与钙离子结合，又由于高密度基因芯片要求高度灵敏的检测，因此，实验过程中涉及到与脱辅基水母发光蛋白接触的任何仪器和试剂都必须是高度无钙的，因为这直接影响到检测的灵敏度。实验中所使用的所有玻璃器皿都必须是无钙玻璃制品，而且在使用前必须经过钙离子络合剂—洗液多次清洗。洗液配方如下：50mM Tris,0.15M NaCl,2mM EDTA,0.05%(v/v)Tween-20,pH7.5.操作程序如下：

- 1.用 1ml 0.1M NaHCO₃, 2mM EDTA,pH8.0(耦合缓冲液)洗涤羧基化磁珠以去除其表面的表面活性剂；
- 2..用一个磁性分离盘将悬浮液分相，并弃去液相；
- 3..重复三次上述操作；用上述洗液洗涤羧基化磁珠，重复三次；
- 4..将羧基化磁珠重新悬浮在耦合缓冲液中，然后将 100 微升的上述悬浮液移入试管中；
- 5.在试管中加 100 微升 1-乙基-3- (二甲基胺基丙基) 碳二亚胺 (EDAC[1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亚胺] (Sigma 公司生产))，振荡，同时加入 1 毫升 0.002mg/ml 的抗地高辛抗体和 8mg/ml 脱辅基水母发光蛋白(两种蛋白的相对配比需要通过实验摸索出一个最佳值以得到最大的放大倍数)到耦合缓冲液中；(1)摆动温育 2 小时；(2)分相，弃上清液，将结合有抗地高辛抗体抗体和脱辅基水母发光蛋白的羧基化磁珠(anti-digoxigenin-conjugated CSMs,AD-CSMs)用 1 毫升缓冲液清洗 2 次，并将其重新悬浮于 1 毫升缓冲液中待用。(3)可以通过 1000 倍以上的光学显微镜或电子显微镜直接观察经过双染色处理的脱辅基水母发光蛋白和抗地高辛在羧基化磁珠上连接的密度和均匀分布情况。或将其用荧光染料或荧光素标记在荧光显微镜下观察也可以达到同样的目的。其它的光学检测方法如酶

联放大法来标记抗地高辛抗体和脱辅基水母发光蛋白以检测二者在羧基化磁珠上结合量，分布情况等，从而有利于找到最佳的耦联条件。

- 6.通过免疫反应将 DIG-mRNA 分子耦联到羧基化磁珠上去生成 mRNA 耦联羧基化磁珠。耦联与未耦联 DIG-mRNA 的羧基化磁珠不用分离纯化可以直接用于杂交，杂交后通过清洗即可将未耦联的羧基化磁珠去除。
- 7.用标记有脱辅基水母发光蛋白的地高辛与上述 mRNA 耦联羧基化磁珠亲和反应生成 mRNA-羧基化磁珠耦联脱辅基水母发光蛋白，简写为 AB-mRNA)。

二、微玻璃珠的信号放大作用：

由于光学磁珠的不透明性，在光信号足够强时，其将无法再维持应有的线性关系，信号强度将达到饱和。因此，为了增大测量线性范围，可以采用透明的微玻璃珠(silica beads, $\phi 0.2\mu\text{m}$)。在微玻璃珠上烷基化固定生物大分子等方法与往玻璃或石英光纤端面上固定生物大分子的程序相同，这里不再述及。

III—杂交，变性再生及生物发光检测总程序

一、杂交：固定于玻璃表面上的 RNA 预杂交，杂交(Northern 杂交)及淋洗等条件，与 DNA 杂交(Southern 杂交)的条件基本相同。杂交中使用的试剂配制，配方及程序如下：

1.配制预杂交液：每个芯片(面积 1cm^2)约需预杂交液 0.2ml.用 0.45μl 的一次性乙酸纤维素膜(Schleicher&Schuell 单流式针筒型滤膜(Uniflow syringe filter) No.57204 或与之相当的产品)过滤杂交液。

50×Denhardt 试剂：5 克聚蔗糖(Ficoll,400 型;Pharmacia)，5g 聚乙烯吡咯烷酮和 5g 牛血清白蛋白(Sigma),加水至终体积 500ml.

预杂交液：0.5%SDS, 5×Denhardt 试剂，100μg/ml 经变性并被打断的鲑精 DNA，
6°C 水浴中温育 1~2 小时或 6×SSPE

2.将芯片浸于一盘 6×SSC 或 6×SSPE 中完全湿润，浸泡 2 分钟。

3.将润湿的芯片装入可加热封接的袋如 Sears Seal-A-Meal 等中，按每个芯片 0.2ml 的量加入预杂交液。将袋内空气排出，封袋，浸入 68°C 水浴中温育 1~2 小时。

4.从水浴中取出杂交袋，剪开一角，加入 0.1ml 2mM EDTA,混合均匀，再加入 0.5ml AB-mRNA 溶液，尽快排除空气，封袋，浸入 68°C 水浴中杂交 20 分钟左右(具体杂交时间可根据探针半复性时间公式计算)。

5.取出杂交袋，剪开一角，倾倒杂交液于弃置的容器内，取出芯片并置入盛有数百毫升 2×SSC 和 0.01SDS 托盘中，于室温温育 1~2 分钟。

二、生物发光检测：由于脱辅基水母发光蛋白始终要求无钙环境下存在，因此在施加发光触发剂之前必须对芯片用 2mM EDTA 溶液充分清洗。发光触发剂配方为：100mM CaCl₂,100mM Tris-HCl,pH7.5,Mie 散射粒子胶体(浓度依情况而定)。发光触发剂加入后用 CCD 进行光量子积分 3 秒钟即可。

三，杂交芯片的再生：杂交后的芯片 100 度水浴中加热使其变性，迅速在冰浴中将芯片骤冷。此时芯片可以进入新一轮的循环使用。

注：本实施例所提供的 cDNA 芯片制作及应用技术在基因芯片中具有代表性，其它如 DNA 芯片，cRNA 芯片等无论核酸链的长短，基本原理一样，技术环节也大同小异，不作赘述。

实施例二 免疫(蛋白)芯片的制作及应用

随着科学的发展，现在免疫分析已成为一种简单快速，灵敏可靠而且经济的医学临床诊断手段。目前免疫检测的范围已经非常广泛，除了传统的抗体，抗原，激素，生长因子，蛋白质，多肽，核酸，神经递质等生物活性物质之外，还有细胞表面标志物，肿瘤特异性抗原，受体，细胞因子，体内药物浓度及传染源等各种微量物质。但是在医疗实践中美中不足的是，医生为了确诊（比如对于肝炎病人）有时不得不让病人对几个指标（亚型）进行逐一检测，以排除其它的可能性。对于一些疑难病例的诊断和治疗效果的随访中又需要对大量的指标进行综合的考察和评价。然而这些全面的指标的获取往往不得不以医务人员和病人的大量时间，劳动量和资金为代价。如果能够制作出包含大量免疫学检测信息的免疫芯片从而仅仅通过一次性检测即可提供一系列全面的免疫学检测清单对于医务人员而言无疑为他们提供了一个进行确诊所需要的综合考察的最佳手段，对于病人而言也是一种省事省钱的好方法。由此可见，免疫芯片的制作在以下几方面有着非常现实的意义：

- 一，在确定某一病的亚型的并行检查中使用可以大大提高诊断效率；
- 二，在诊断疑难病情中可以为医生提供一个确诊的全面而确凿的根据；
- 三，如果同时地综合检测各种肿瘤标志物，肿瘤抗原如 aFP，CEA，CA₅₀，CA₁₉₋₉，CA₁₂₅ 等，再辅以其它检查对于肿瘤的早期诊断从而为肿瘤的早期发现，及早治疗，延长病人生命和根治提供了一个重要途径。

四，在例行性身体检查中可以提供一个综合的健康状况的指标清单。

另外，随着蛋白组学研究的不断深入，蛋白芯片的出现将为之提供一个大通量扫描的分析工具，因而也就具有广阔的应用前景。

I—免疫芯片的制作(蛋白芯片的制作及标记程序类似)

由于免疫芯片在一定程度上是制作基因芯片的基础，因此相对而言较为容易。首先也是光纤的硅烷化。然后可以用戊二醛法将带有大量赖氨酸残基的免疫配体与通过石英等表面产生的烷胺基将免疫配体连接到固体表面上。除此以外，这里再介绍一种可再生性免疫芯片的制作方法。这种芯片的优点是显而易见的，即它可以重复多次使用（在免疫表面显著失活之前可以回收利用多达 50 次），从而大大降低检测成本。

可再生性免疫芯片的工作原理可以在石英光纤端面固定荧光标记的抗人血清白蛋白抗体 F(ab')₂ 片段作为一个例子来说明。其它配体的固定等方法可以依次类推或寻找相应的方法。

法。检测时，如果样品中存在人血清白蛋白它就会结合到光纤表面。这种荧光标记可以通过激光激发产生荧光再用 CCD 检测荧光信号。之后免疫芯片可以通过简单地浸入 Chaotropic media 中而得以再生。在这种情况下，抗原抗体复合物将被选择性地分开而不影响芯片上生物标记物的活性。其操作程序如下：

一、抗人血清白蛋白抗体 $F_{(ab')}$ 片段在光纤表面的固定及标记：

- (1) 清洗石英端面。用 HF 清洗 10 分钟，浸入铬酸溶液中 1 小时，再用 6M HCl 洗涤 24 小时，最后用大量的水冲洗。
- (2) 合成硅基化基底。将光纤用 100 毫升 10%GOPS ((3-缩水甘油丙氧基)-三甲氧基-硅烷, 96%, Aldrich, Milwaukee, WI) 并磷酸缓冲液调至 Ph3.5，加热至 90 度 2 小时并轻微振动。之后光纤分别用 100 毫升的水，无水丙酮，无水乙醚淋洗，过夜放置。
- (3) GOPS 活化。先用 50 毫升无水丙酮淋洗，加几毫升的无水丙酮和 0.70ml 吡啶。边缓慢旋转容器边缓慢加入 200 微升 tresyl chloride。将反应混合物保持在 0 度 25 分钟，再用以下 100 毫升溶液依次洗涤光纤：30/70, 50/50, 70/30(丙酮-5mM HCl(v/v)) 和 1mM HCl。
- (4) 抗人血清白蛋白抗体 $F_{(ab')}_2$ 片段的耦合。首先从完整的 $F_{(ab')}_2$ 中制备 $F_{(ab')}$ 。即将 0.10ml $F_{(ab')}_2$ 溶液（约 1mg/m 总蛋白）放入一个小的玻璃容器中。加入 19.90ml 的由 0.10M pH6.0 PBS, 25mM EDTA, 和 6mM 二硫代 threitol 组成的溶液。鼓 N₂ 2 个小时以混匀溶液。这时形成 $F_{(ab')}_2$ 的二硫键被还原而形成 $F_{(ab')}$ ，并通过 24h 透析 500ml 的 0.10M pH 为 6.0 的含有 25mM EDTA 的 PBS 来分离之。整个溶液通过 2 小时鼓氮气来净化同时 $F_{(ab')}$ 被立即固化在光纤表面，封好，并在 4 度放置 24 小时。之后将之反复用 0.1M pH 为 7.4 的 PBS 和 0.1M 的磷酸洗涤。这样可以清除未固化或非特异性吸附的抗体。之后再用 1mM 的 TRIS (pH8.2) 缓冲液失活未反应的 tresyl 基团。
- (5) 荧光标记 $F_{(ab')}$ 。首先将光纤用含有 0.10mg/ml 的 HAS 平衡。其目的是为了在标记之前保护 $F_{(ab')}$ 的活性部位。之后用 PBS (pH8.5) 淋洗并转移至 0.1uM 的 pH 为 8.5 的 dansyl chloride 的溶液中。之后取出反复用 PBS 和磷酸缓冲液淋洗以去除 HAS 之后存放在 4 度的 PBS 中。

二、免疫表面固定效果的鉴定：可以使用 FITC 标记的 HAS 滴定实验两个技术来独立地检测上述固定和标记程序中的每一步。光线端面的活性 $F_{(ab')}$ 可用以知浓度的 FITC-HAS 的滴定。

注意：直接在 $F_{(ab')}$ 进行荧光标记十分有利于固定效果的检测，它也仅仅用于寻找最佳固定条件，在确定了这个最佳条件之后我们并不采用这种方法进行免疫临床分析。

I- 配体标记

把大量的不同种类的抗体或抗原固定到光纤表面之后只有用一个通用的探针去检测特异性结合情况对于免疫芯片来说才是可行的。在这个原则下可以选择的方法仍然是很多的。这里仅推荐一种免疫结合和标记方式，即配体的生物素化，荧光标记法和酶偶联法。

这种方法首先是让抗原与固定的抗体片段结合，然后用生物素化的第二抗体作为报告分子与抗原-抗体复合物结合，再用链亲和素与生物素发生亲和反应，最后用通用的生物素化的标记分子与结合了的链亲和素结合（注意链亲和素在这里的放大作用）。最后或显色或激发荧光或触发生物或化学发光进行检测。所以，这种方法需要对蛋白如抗体，抗原或酶分别进行生物素化。由于采用了非竞争法结合，因而该法检测的灵敏度与线性范围方面都比竞争性结合有大大的提高。

这里提供一种广泛适用的蛋白质生物素化方法，以根据需要分别对抗体，抗原和酶进行生物素化。这种方法是基于通常情况下蛋白质表面具有很多赖氨酸残基，而且这些残基又不参与结合反应，所以通过它们进行标记对生物活性影响极少。这种方法使用 BNHS 与蛋白质的赖氨酸偶联。以制备生物素化抗体 IgG(生物素化抗原的制备方法与此相同，只是要确定最佳 BNHS 用量)为例，其程序如下：

1. 将 2 毫克纯 IgG 溶解在 0.1M 的 NaHCO₃ 溶液里，在 4 度透析，过夜存放；
2. 在上述溶液中加 10ul, 0.1M 的 BNHS 溶液（该溶液是用 1mg 的 BNHS 溶解在 30ul 的 DMSO 或 DMF 中制备而成）。在室温下放置 1h；
3. 用 0.01M 的 PBS 缓冲液 (pH7.4) 透析，过夜。加等体积的甘油后 4 度最好在零下 20 度存放。使用前用缓冲液稀释。

被生物素化的特异性第二抗体在温育前可以一同加入，也可以事先进行混合作成试剂盒与免疫芯片进行温育。生物素化的通用标记物可以是荧光分子，也可以是 ELISA 中的酶如 AP, HRP 等，也可以是生物或化学发光的酶或化学分子。但无论是那一种方法，都适用于光纤基芯片的检测。在这个方面从方法上讲都已相当成熟，不作赘述。

实施例三 细胞(受体)芯片的制作及应用

激素，抗原，药物，毒素和神经递质等一系列广谱的物质(配体)对于生物体的作用首先是从细胞受体开始的。主要从事激素和药物作用原理的受体学的研究对于神经生理学，酶学，药理学，病理学和细胞生物学等各学科都有着十分重要的意义。然而在研究受体实践中却面临着受体含量少，很多受体作为细胞膜的组成成分在分离后因高级结构的破坏极易失去原有生理和药理活性等困难。在分析品种繁多的配体和受体相互作用时，用常规的分析方法简直无异于大海捞针。我们需要一种可以大规模筛选以建立各种配体和受体之间的关系网，从而为进一步研究或统计提供依据。创建细胞芯片—将各种特征细胞(各种组织细胞，正常细胞和病理细胞，细菌等)或表现不同特性的同一类细胞(用同一种细胞通过基因工程技术表达不同受体或细胞内结构蛋白)集成地固定在毛细管内壁上并拼装成芯片。分析时将被报告分子标记的感兴趣的物质与细胞芯片进行结合，通过检测可以大范围地筛选并建立这种联系网。这对于具有特殊功能基团的药物筛选或发现新药物有着重要意义。

I—细胞芯片的制作

细胞芯片的制作主要是将细胞固定在毛细管的内壁上，其它诸如芯片拼装皆与光纤基芯

说 明 书

片相同，只是相应地将拼装器的各有关尺寸作一些调整。细胞固定可以分以下几个过程：

一、毛细管的预处理：首先将毛细管束两端烧结进行如前所述为光纤进行镀镍银镀列室的程序进行化学镀，然后将两端烧结部分裁剪，在研磨抛光之后进行内壁的处理。

二、毛细管内壁硅烷化：可以采取上述气相硅烷化法通过在玻璃或石英表面上引入烷氨基，然后可以用下述方法将蛋白如链亲和素固定到内壁上：

1. 使用戊二醛作为偶联剂通过蛋白质表面的胺基将之固定上去；
2. 使用 DCI (pH7, 在碘基琥珀酰亚胺碘基-NHS 存在下) 通过缩水反应将蛋白质表面的羧基与胺基连接起来。

上述方法可以产生致密均匀的链亲和素单分子层，可以直接用于亲和反应。

II—细胞表面生物素化及其在毛细管内壁的固定

一、细胞表面生物素化：1-溶液配置：(1) PBS/CM：PBS 溶液中含 1.0mM MgCl₂ 和 1.3mM CaCl₂。将 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 溶液缓慢加入装有 200 毫升 5×PBS 的，然后用 ddH₂O 稀释到 500 毫升的烧杯中，以防金属离子的沉淀。PBS/CM 溶液一定要新鲜配置，尽快使用。(2) 碘基-NHS-生物素或碘基-NHS-LC-生物素：这些溶液使用前在 PBS/CM 溶液中的浓度稀释到 0.5mg/ml。(3) 在 PBS/CM 中 50mM 的 NH₄Cl 溶液。用以在标记反应结束时使过量的生物素失去反应性。再配置 50mM NH₄Cl 的 PBS/CM 溶液。在 48ml 的 ddH₂O 中加入 0.26g 的 NH₄Cl, 1ml 的 1.3M CaCl₂, 1ml 的 1.0M MgCl₂。2-生物素化程序：下面所有试剂都经冰镇处理而且所有步骤都在冰上操作。(1) 在细胞悬浮液加入加入冰镇的 PBS/CM，然后加入新鲜配制的 Sulfo-NHS-B (在 PBS/CM 中浓度为 0.5mg/ml)；(2) 在 20min 的 4°C 的温育过程中轻轻晃动容器；(3) 重复上步操作；(4) 过滤细胞并将之转移到另外一个烧杯中，换之以 1ml 的 50mM NH₄Cl 的 PBS/CM 溶液以终止反应。在 4°C 下轻轻摇晃温育 10min；(5) 用 PBS/CM 溶液透析细胞悬浮物两次；(6) 将生物素化细胞在-80°C 存放，以使一些蛋白酶处于非活性状态。

二、细胞在毛细管内壁的固定：1-生物素化细胞用 Tris-HCl (pH7.5) 缓冲液形成悬浮液后，再让过量的悬浮液缓慢不断 (4°C 温育，持续 25min) 流经仅约 3-5 毫米的毛细管束即可；2-用灭菌蒸馏水充分缓慢淋洗毛细管束，放置 1 小时待用。

II—过渡金素活化支持物法细胞固定

程序如下：将 1 克酸洗的毛细管中加入 3 毫升在 15% (w/v) 的盐酸溶液中的 15% (w/v) TiCl₄ 溶液。在 45 度的烘箱中将该化合物加热 48 小时，以形成过渡金素的氯氧化合物。将该化合物用 3×10 毫升水洗涤得到过渡金素的水合氧化物。将 10 毫升 2% 的细胞悬浮液加入，并在 4 度保持 2 小时。将过多的悬浮液除去，并将固态的制备好的细胞固定物用 3×10 毫升水和 10 毫升 0.01M 乙酸钠缓冲液洗涤。

IV—探针标记

由于受体的配体的结构多样化，标记方法也只能根据配体的特征，如果是蛋白质类则

上述的一些在蛋白质上连接酶如 AP, HRP 等方法依然是很好的方法；而如果是简单有机化合物结构的药物分子或多肽类激素等的话，可以使用化学发光试剂如 γ -淀酶 AE 等。这需要根据这些配体的活性尤其是非活性部位的具体结构特征找出一种较少影响配体生物活性的标记方法，这里不在一一阐述。

实施例四 化学(材料)芯片的制作及应用

在药理学研究中往往想知道一个细胞里全部被表达的生物活性物质如蛋白质，糖蛋白，脂蛋白，受体，及酶等，然而对于它们的鉴定却是一个让人望而生畏或几乎不可能做到的事。由于大多数蛋白质都有自己特异性的底物或亲和物，而且这些物质往往是一些小分子的化合物（如辅基和辅酶）或配体（如多肽，激素，药物分子，毒素，生物碱等）。由于相比之下固定这些小分子的方法有时候不得不多样化，但一旦这些物质被固定在芯片上形成化学芯片，这种芯片却具有很多优越于生物大分子芯片的地方，比如在稳定性，保存条件的简易性（无氧，干燥，避光，阴冷等即可长期保存），制作成本的低廉性等方面都是生物大分子芯片所无法比拟的。这种芯片的检测也极其简易，只需将用于考察的总蛋白质（包括所有经修饰过的蛋白质）一概生物素化并用于与化学芯片亲和反应，再用链亲和素与生物素化的结合物进行亲和反应，最后用生物素化的信号标记分子与前面形成的（配体-蛋白质-生物素-链亲和素）复合物结合形成标记了的（配体-蛋白质-生物素-链亲和素-生物素-标记分子）复合物，通过触发信号分子产生信号进行检测。通过首先分别将已知蛋白质逐种与化学芯片亲和建立与芯片上的化学分子或生物小分子发生特异性亲和的生物大分子对应关系网。由蛋白质文库建立与之有特异性结合的化学小分子文库，再用这些文库拼装新的化学芯片。按这种方法组建的化学芯片可以直接应用的领域首先是基因和细胞最终表达产物的广谱研究和可以建立蛋白质文库的蛋白组学研究等。

在材料科学的研究中，将代表不同性能信息和结构信息的光纤或毛细管根据生命科学中的组合技术拼装成微方阵并进行并行筛选便可以大大提高材料的合成和优化效率。可以通过离子注入或化学合成的方法使光纤或毛细管具有不同的性能信息和结构信息。

对于像天然或合成药物，化学小分子，激素，毒素等的标记方法可以利用连接臂将化学分子固化到各种形式（具有烷胺基，羟基等）的硅烷化光纤端面上；蛋白质的固化及其生物素化参看前面有关内容。由于广泛存在的依赖辅酶的酶无论在合成立体专一性化合物还是在分析应用中都有着广泛的应用意义，下面介绍一些 NADP⁺, NAD⁺, ATP, ADP 等辅酶的固定方法作为这一方面的一些实例。以 NADP⁺的固定方法为例（其它与此相似）：

合成 NADP⁺, NAD⁺, ATP, ADP 等辅酶的 N⁶-羧甲基-和 N⁶-((6-氨基己基)-甲氨酰基甲基)的衍生物：(a) 用碘乙酸(pH6.5)烷基化产生 1-烷氧甲基核苷；(b) 在过硫酸盐, pH11, 75°C 下加热一小时，之后在乙醛作用下重排产生 N⁶-羧甲基核苷；(c) 加入碳二亚胺和二胺基己

说 明 书

00·12·17

烷(pH4.0)与1,6-二胺基己烷缩水产生N⁶-((6-胺基己基)-甲氨酰基甲基)-核苷；(d)在有溴化氰和经硅烷化后具有伯胺基的光纤和毛细管存在下，上述辅酶可被固定在这些载体上。该方法利用二胺基己烷为连接臂与辅酶形成辅酶类似物并固定到固相表面上，从而有利于保持甚至增强依赖辅酶的酶，如葡萄糖-6-磷酸酯脱氢酶，6-磷酸葡萄糖酯脱氢酶，1-谷酰氨基酯脱氢酶，甘油激酶等的生物活性。

其它辅酶如FMN, cAMP等也都有相应的固定方法，不一一列举。

实施例六 联合生物芯片的应用

鉴于各种生物芯片各自从不同的角度对生物物质进行检测从而提供不同侧面的信息内容，又由于生物本身的内在联系十分广泛，所以由生物芯片从各个不同侧面提供的大量综合性信息必然有助于人们探索更深列次和更广泛的信息内容。由此可见芯片分析的联合使用在科学领域里有着潜在而深远的应用前景。在浩瀚的生命信息的海洋里，它们为人们提供了一套全新的方法学武装。

就以细胞芯片与化学芯片或基因芯片的联合使用为例来说明药理学研究中如何运用这种武器。首先，可以通过细胞芯片筛选出许多仅对某些特异性受体结合的配体，这些配体可以是药物分子或具有某个功能基团的化合物，激素或毒素等。显然这些配体有可能成为特异性很强的药物或者毒物。药理学家在经筛选并建立起这个一一对应的配体-受体关系网之后还想进一步知道感兴趣的每一种业已发现的关系的后效应有哪些。对于这些后效应的考察范围和深度药理学家希望尽可能地宽一些和深一些。为了考察哪些基因被调控：被诱导而得以表达或被抑制而未被表达，需要运用cDNA芯片对组织中的基因表达谱进行研究。由此可以知道，研究的配体在转录列次上对于生命体产生的综合效应。这些信息对于判断一个配体是否适合于作为一个药物是非常可靠和科学的根据。而要考察配体的最终效应，则可以与化学芯片联合使用。

说明书附图说明

附图 1-1. 小室工作原理图

附图 1-2. 列室的俯视图。

附图 1-3. 列室与起密封和减震作用的橡皮封条(rubber buffer)，起保护作用的刚性护套(holder)的装配示意图。

附图 1-4. 装配起来的列室与E型软磁铁铝合金磁芯的装配图(主视图)。

附图 1-5.E型软磁铁铝合金结构(俯视图)。

附图 2.信号检测及处理系统示意图。

附图 3.生物发光反应原理图。

1983.10.17

说 明 书 附 图

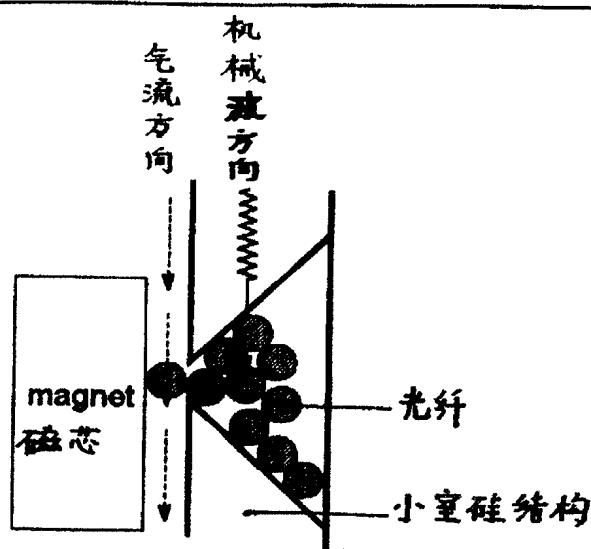
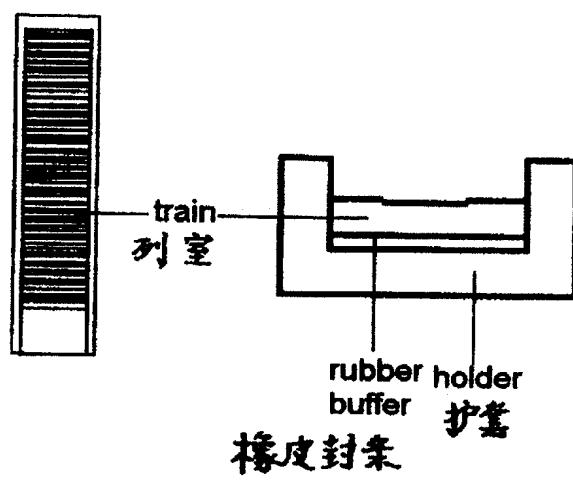


图 1-1

图 1-2

图 1-3



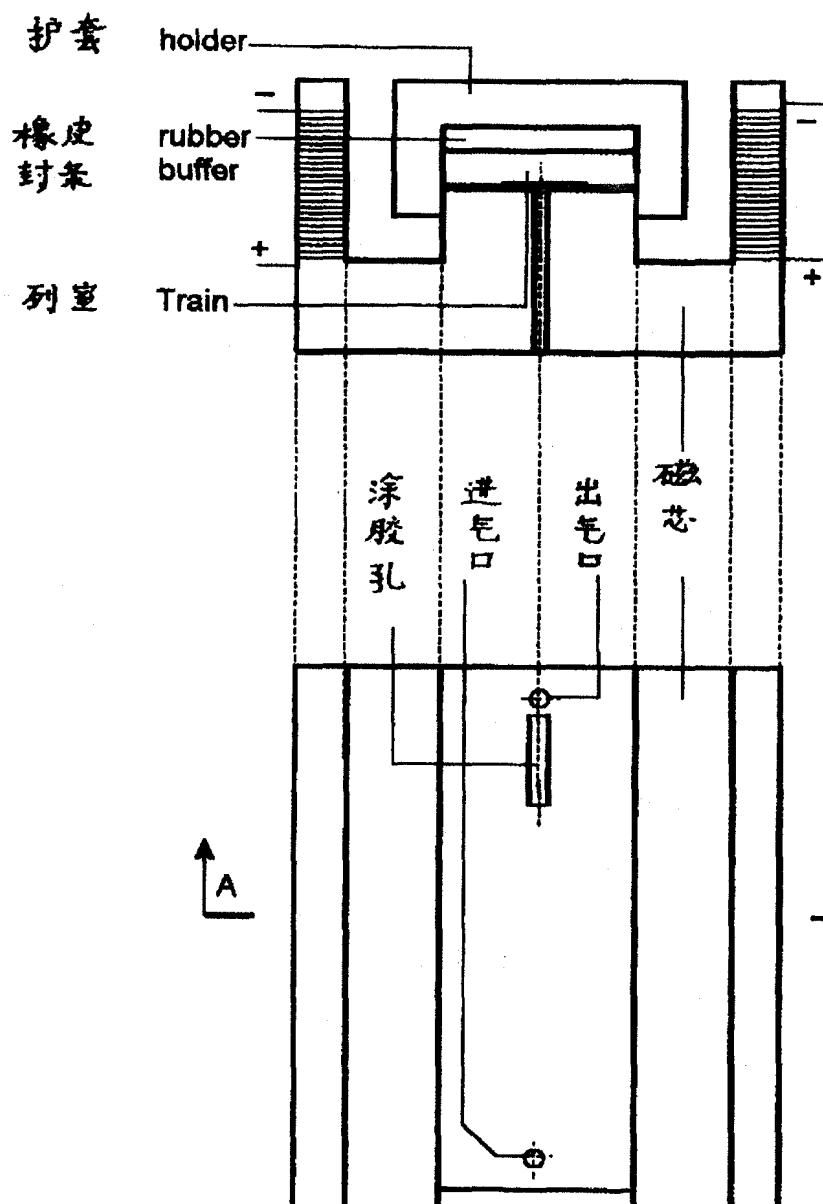


图 1-4

图 1-5

图2.信号检测及处理

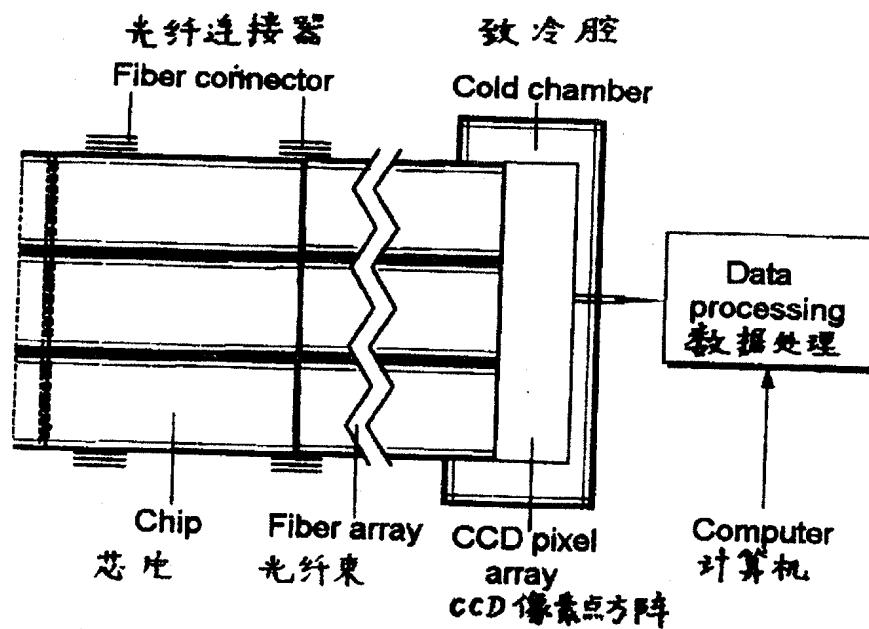


图3.生物发光反应

